

学校编码: 10384

分类号_____ 密级_____

学号: 24520101153293

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

FTY720 联合共刺激分子单克隆抗体诱导延长同
种异基因抗原致敏小鼠心脏移植的存活及机制
研究

FTY720 combined with costimulator monoclonal antibody prolonged
survival time of heart transplantation of allogeneic-primed mice

陈志刚

指导教师姓名: 齐忠权 教授

专 业 名 称: 外 科 学

论文提交日期: 2013 年 04 月

论文答辩日期: 2013 年 05 月

学位授予日期: 2013 年 月

答辩委员会主席:

评 阅 人:

2013 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在 齐忠权 导师指导下,独立完成的
研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成
果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研
究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(记忆性移植)课题(组)的研究成果,
获得(齐忠权教授)课题(组)经费或实验室的资助,在(厦门大
学器官移植研究所)实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题
组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

2013 年 4 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ☒ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

2013 年 4 月 日

目 录

摘要（中文）	1
ABSTRACT.....	3
第一、前言	7
1 器官移植概述	7
2 T 细胞及其与器官移植研究进展	9
2.1 Th1/Th2 与器官移植.....	10
2.2 Treg 与器官移植	11
2.3 Tc 与器官移植.....	12
3 记忆性 T 细胞与器官移植研究进展.....	12
3.1 Tm 细胞的免疫学特性	12
3.2 Tm 的分型与功能	15
3.3 Tm 与器官移植研究进展	16
3.4 免疫抑制方案作用于 Tm 诱导耐受的研究进展	18
4 FTY720 研究进展.....	20
5 共刺激分子单克隆抗体研究进展	24
6 小鼠颈部异位心脏移植的意义	25
7 研究目的、创新、意义及内容	26
第二章、实验材料和方法	27
1 实验材料	27
1.1 实验动物.....	27
1.2 实验仪器和耗材.....	27
1.3 实验药物试剂.....	28
2 实验方法	29
2.1 免疫动物模型的构建.....	29
2.2 组织学试验方法.....	34
2.3 细胞学检查实验方法.....	36
2.4 基因蛋白相关实验及方法.....	42

2.5 统计学分析.....	47
第三章、实验结果及分析	49
1 FTY720 和共刺激分子单克隆抗体延长初次小鼠心脏移植物生存期及机制初探.....	49
1.1 FTY720 和共刺激分子单克隆抗体对初次心脏移植物生存期的延长	49
1.2 FTY720 和共刺激分子单克隆抗体抑制 T 淋巴细胞的增殖.....	49
1.3 FTY720 和共刺激分子单克隆抗体减少初次移植心脏的淋巴细胞浸润..	50
2 FTY720 联合共刺激分子单克隆抗体延长同种异基因预致敏小鼠心脏移植的生存期及机制研究.....	52
2.1 FTY720 和共刺激分子单克隆抗体延长同种异基因预致敏小鼠心脏移植生存期.....	52
2.2 FTY720 和共刺激分子单克隆抗体减少预致敏小鼠外周血 T 细胞和 T _H 1 细胞.....	52
2.3 FTY720 和共刺激分子单克隆抗体使外周血中细胞因子水平发生变化..	53
2.4 FTY720 和共刺激分子单克隆抗体对脾脏 T _H 1、T _H 2 的影响	54
2.5 FTY720 和共刺激分子单克隆抗体对外周淋巴结中 T 淋巴细胞、T _H 1 和 T _H 2 的影响	55
2.6 FTY720 和共刺激分子单克隆抗体对 T 细胞和 T _H 1 功能的影响	56
2.7 FTY720 和共刺激分子阻滞剂对二次心脏移植物影响	58
2.9 FTY720 以及共刺激分子阻滞剂的毒副作用浅析	59
第四章、讨论	61
第五章、结论和展望	64
参考文献	65
附录一 文中部分缩略词中英文对照.....	79
附录二 致谢	81
附录三 研究生期间参与发表文章.....	82

Contents

Abstract(chinese)	1
Abstract(english)	4
Chapter I :Introduction	7
1 The organ transplant Overview	7
2 T cells and organ transplantation research Progress	9
2.1 Th1/Th2 organ and transplantation.....	10
2.2 Treg and organ transplantation.....	11
2.3 Tc and organ transplantation	12
3 Memory T cells and organ transplantation research Progress	12
3.1 Tm cell immunological characteristics.....	12
3.2 Tm sub-type and function	15
3.3 Tm and organ transplantation research.....	16
3.4 The role immunosuppressive regimen in Tm-induced tolerance.....	18
4 FTY720 Research Progress	20
5 Costimulatory molecules monoclonal antibody research progress	24
6 The mice cervical heterotopic heart transplantation significance	25
7 The research purposes, innovation, significance and content	26
Chapter II : Materials and methods	27
1 Materials	26
1.1 Animals	26
1.2 Experimental apparatus and supplies	27
1.3 Experimental drug reagents	28
2 Experimental Methods	29
2.1 Immunizing an animal model	29
2.2 Histology test methods	34
2.3 Cytology experimental methods	36
2.4 Gene protein experiments and methods	42
2.5 Statistical analysis	47

Chapter III: Experimental results and analysis	49
1 FTY720 and costimulatory molecules monoclonal antibody to extend the the initial murine cardiac allograft survival and mechanisms Preliminary	49
1.1 FTY720 and costimulatory molecules monoclonal antibody prolongation of the initial cardiac allograft survival	49
1.2 FTY720 and costimulatory molecules, monoclonal antibody inhibits T lymphocyte proliferation	50
1.3 FTY720 and costimulatory molecules monoclonal antibodies to reduce the initial cardiac allograft lymphocyte infiltration	51
2 FTY720 combined with costimulatory molecules monoclonal antibody prolong allogeneic pre-primed mice heart transplant survival and Mechanism	52
2.1 FTY720 combined with costimulatory molecules monoclonal antibody prolong allogeneic heart transplant survival of pre-sensitized mice	52
2.2 FTY720 and costimulatory molecules monoclonal antibody to reduce pre-sensitized mice peripheral blood T cells and T _m	52
2.3 FTY720 and costimulatory molecules monoclonal antibodies in the peripheral blood cytokine levels change	53
2.4 FTY720 and costimulatory molecules monoclonal antibody spleen T _{EM} , Treg	54
2.5 FTY720 and costimulatory molecules monoclonal antibody to peripheral lymph node T lymphocytes, T _{EM} and Treg	55
2.6 FTY720 and costimulatory molecules monoclonal antibody impact on the function of T cells and T _{EM}	56
2.7 FTY720 and costimulatory molecule blockers affect the secondary cardiac allograft	58
2.9 FTY720 and the the costimulatory molecules blocker side effects of the	59
Chapter IV: Discussed	61
Chapter V: Conclusions and Outlook	64
References	65
Text abbreviations	79
Acknowledgements	81

Published papers.....	82
-----------------------	----

厦门大学博硕士论文摘要库

摘要

背景和目的:临床上器官功能衰竭终末期需要进行器官移植的患者,实际上大部分由于受到多次感染、妊娠、多次输血、透析或者已行组织/器官移植,使得体内存在不同水平的抗原特异性或者非特异性记忆性 T 细胞 (T_m),对二次移植可产生超急性排斥反应。皮肤预致敏小鼠可以模拟人体内的这种 T_m 存在的状态,我们尝试在皮肤预致敏小鼠的二次心脏移植模型中,使用 FTY720 和共刺激分子单克隆抗体的抑制方案,尽量减少 T_m 对二次移植物的浸润,从而达到延长移植植物生存期的目的,并探讨此中可能的机制。

方法:首先构建从 BALB/C 小鼠到 C57BL/6 小鼠的初次背部皮肤移植,4 周后,受体 C57BL/6 小鼠排斥掉移植的皮肤,以此皮肤预致敏小鼠为受体, BALB/C 小鼠为供体,进行颈部异位心脏移植术,即是二次移植。根据用药治疗情况分成四组,对照组、FTY720 组、共刺激分子单克隆抗体组和联合用药组。给药方案为:FTY720 的剂量为 $2\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$,心脏移植术前 3 天给药,直至术后第 14 天;共刺激分子单克隆抗体 (Costimulator molecule monoclonal antibody, anti-mouse-LFA-1 and anti-mouse-CD40L mAb) 用量分别为 0.1mg/次 anti-mouse-LFA-1 mAb 和 0.25mg/次 anti-mouse-CD40L mAb,术后第 0, 2, 4, 6 天各给药一次。观察心脏移植植物生存期,运用免疫细胞学、分子学和蛋白学检测 T_{EM}、Treg 细胞, IL-2、IFN- γ 和 IL-10、TGF- β 等细胞因子,以及移植植物中细胞因子 mRNA 表达的情况和移植植物病理切片等研究其可能机制。

结果:1、FTY720 组和共刺激分子单克隆抗体治疗组的平均生存期 (mean survival time, MST) 分别为 4.6 天和 4.7 天,比较对照组 MST 为 3.4 天,具有差异性 ($P<0.05$);在联合用药组, MST 达到了 18 天,比较对照组和共刺激分子单克隆抗体组差异性显著 (P 均 <0.001)。2、在受体鼠外周血,治疗组的 CD4^+ 和 CD8^+ T 细胞均明显降低 ($P<0.01$);同时 FTY720 能使外周血中的 CD4^+ 和 CD8^+ 效应性 T_m (T_{EM}) ($\text{CD44}^{\text{high}} \text{CD62L}^{\text{low}}$) 比例下降 ($P<0.01$),联合组比较共刺激分子单抗组, T_{EM} 比例下降也均具有显著统计学差异 (P 均 <0.01)。FTY720 使得脾脏中的 $\text{CD4}^+\text{T}_{\text{EM}}$ 、 $\text{CD8}^+\text{T}_{\text{EM}}$ 比例比较对照组没有统计学差异 ($P>0.05$);联合组 $\text{CD4}^+\text{T}_{\text{EM}}$ 的变化较为显著 ($P<0.01$);FTY720 组和联合组的 $\text{CD4}^+\text{FOXP3}^+$

Treg 比例比较对照组有明显的升高 (P 均 <0.01), 联合组比较单克隆抗体组升高亦具有统计学差异 ($P<0.05$)。外周淋巴结的 T_{EM} 变化与在脾脏中相似; 比较对照组, Treg 在联合组的比例有明显升高 ($P<0.05$)。3、MLR 结果显示, FTY720 可以明显抑制 T 淋巴细胞增殖, 联合组更明显 (P 均 <0.001), CFSE 荧光染色测定 T 细胞增殖实验的结果与此类似; MLR 上清的细胞因子含量测定显示 FTY720 组 IL-2, INF- γ 水平有不同程度下降, 联合组更明显 ($P<0.001$); TGF- β 在联合用药组变化趋势与 IL-2 相反 ($P<0.05$)。4、FTY720 可以明显减少 $CD8^+T_{EM}$ 对心脏移植物的浸润; 心脏移植病理 ISHLT 评分也显示了 FTY720 和联合用药组比较对照组存在明显差异 (分别 $P<0.05$ 和 <0.001); 联合用药组比较单用抗体组, ISHLT 评分差异也具有显著性 ($P<0.001$); 治疗组心脏移植物的 IL-2、INF- γ mRNA 的表达有不同程度下降, 此差异在联合组最为明显 ($P<0.01$); 而 IL-10、FOXP3 的趋势则与 IL-2 等相反。5、通过体重记录和相关器官组织的病理切片评分, 评估 FTY720 和抗体对受体小鼠的短期不良反应, 发现两者的安全性较好, 病理评分不认为有肝肾肺和胃肠道的急性损害作用。

结论: ① FTY720 促进归巢, 致使外周血 $CD4^+$ 和 $CD8^+T$ 细胞减少, 并且大幅度减少 $CD4^+$ 和 $CD8^+T_{EM}$ 亚群的比值, 减少 T_{EM} 对移植物的浸润; ② FTY720 单独运用或者联合共刺激分子单克隆抗体可以诱导 Treg 的增殖、分化, 增加 IL-10 和 TGF- β 的 mRNA 表达, 促进其分泌的相应细胞因子水平升高; ③ FTY720 可以明显抑制 T_{EM} 的增殖, 抑制 T_{EM} 分泌 IL-2、INF- γ 等细胞因子, 联合共刺激分子单克隆抗体可以协同加强此抑制功能; ④ FTY720 和共刺激分子单克隆抗体的短期不良反应较小。

关键词: FTY720; 共刺激分子单克隆抗体/共刺激分子阻滞剂; 记忆性 T 细胞; 心脏移植

ABSTRACT

Background and purpose: In clinically, organ transplantation is required for organ failure patients with end-stage, in fact, because of reduplicated infection, pregnancy, multiple blood transfusions, dialysis, and been-performed tissue/organ transplant, there are different levels of specific or non-specific antigen memory T cells (T_m) in the body, the secondary transplantation can produce hyperacute rejection. Allogeneic primed by the skin in mice can simulate the state of the T_m in human body. We try to use FTY720 and stimulate molecular monoclonal antibody inhibition the T_m infiltration of secondary graft in the skin-primed secondary heart transplantation model in mice. So as to achieve the objective of prolonging graft survival, and provide a deeper study to discussed the possible mechanism.

Method: We transplanted the dorsal skin from BALB/C to C57BL/6. 4 weeks later, C57BL/6, receptor mice, rejected the transplanted-skin, which was called primed mice, BALB/C as donors, performed cervical heterotopic heart transplantation, which was the secondary transplantation. According to the different treatment methods, we divided them into four groups: control group, FTY720 group, costimulator monoclonal antibody group and combination group. Dosage regimen as: FTY720 was 2mg•kg⁻¹•day⁻¹, administered the 3rd day before heart transplantation until the 14th day after transplantation; costimulator monoclonal antibody were used for 0.1mg•day⁻¹ anti-mouse-LFA-1 mAb and 0.25mg•day⁻¹ anti-mouse-CD40L mAb, at the same day and the 2ed, 4th, 6th day after the transplantation. In order to study the possible mechanism of the treatment program, we observed the cardiac allograft survival, used cytopathological, molecular and protein examinations to detect the T_{EM}, Treg cells, the levels of IL-2, IFN-γ and IL-10, TGF-β, and expression of cytokine mRNA in graft and pathological of graft.

Results: 1, The meam survival time (MST) of FTY720 group and the molecular monoclonal antibody group were respectively 4.6 days and 4.7 days, compared with control group—3.4 days, with the statistical differences (P<0.05). In the combined

group, the MST reached 18 days, with the statistically significant difference ($P < 0.001$). **2**, In peripheral blood, we found that the proportion of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells in the groups of FTY720, monoclonal antibody and combination can be decreased significantly ($P < 0.01$); T_{EM} ($CD44^{hi} CD62L^{lo}$) in $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells decreased with the statistically significant difference ($P < 0.01$) in these treatment groups. There were no statistical differences with the ratio of $CD4^+ T_{EM}$ and $CD8^+ T_{EM}$ of spleen in FTY720 group, compared with the control group ($P > 0.05$); $CD4^+$ and $CD8^+ T_{EM}$ in combined group separately decreased compared with the mAb and control group (all $P < 0.05$); FTY720 can significantly induced proliferation of $CD4^+ FOXP3^+$ Treg in spleen compared with the control group ($P < 0.05$), the same variation tendency in combined group ($P < 0.01$). T_{EM} in lymph node changed similarly in the spleen. Compared with the control group, Treg of lymph node in the combined group, there was a significant increase of the proportion ($P < 0.05$). **3**, In MLR, FTY720-alone and combined with the mAb of costimulation molecules can inhibit T lymphocyte proliferation most obviously ($P < 0.001$), the result of CFSE is similar ($P < 0.001$). In the culture supernatant of MLR, cytokine content determination showed that the levels of IL-2, INF- γ in FTY720 group have different degree of decline, the combination group was more obvious ($P < 0.001$); TGF- β in the combination group change trend is just the opposite of IL-2 ($P < 0.05$). **4**, FTY720 can decrease the infiltration of $CD8^+ T_{EM}$ in cardiac graft. The ISHLT pathology score of cardiac grafts also shows the significant difference in FTY720 and combined groups ($P < 0.05$ or < 0.001). The IL-2, IFN- γ mRNA expression levels of cardiac grafts suggest that FTY720 and costimulation molecules mAb have different level drops, there was the greatest significance of difference in combined group ($P < 0.01$), and the trend of IL-10, FOXP3 mRNA expression levels were in contrast to the IL-2, IFN- γ . **5**, We through pathological section weight records and related organ score, short-term adverse reactions to recipient mice to evaluate FTY720 and mAb, found they were more safety; pathological score don't show the effects of FTY720 and mAb of acute damage in liver, lung or gastrointestinal tract.

Conclusion: ① FTY720 promote the lymphocyte homing, that result to $CD4^{+}$ and $CD8^{+}$ T cells be decreased in peripheral blood, and it can greatly reduce the ratio of $CD4^{+}$ and $CD8^{+}$ effector Tm to protect the graft to infiltrate of effector Tm. ② FTY720 used alone or combined with costimulator monoclonal antibody can induce Treg proliferation, differentiation, increase expression of IL-10 and TGF- β mRNA, promote the secretion of the corresponding elevated cytokine levels. ③ FTY720 can significantly inhibit the proliferation of effector Tm, the IL-2, IFN- γ secreted by effector Tm cells. ④ The short-term adverse reaction of FTY720 and costimulatory molecule monoclonal antibody was slight.

Keywords: FTY720; Costimulator molecule monoclonal antibody/Costimulatory molecule blockers; Memory T cells; Heart transplantation

厦门大学博硕士论文摘要库

第一、前言

1 器官移植概述

1954 年, 美国波士顿, Joseph Murray 医生, 指导完成世界首例同卵双生姐妹的肾移植成功, 为临床医生挽救终末期器官功能衰竭患者的器官移植、失明患者的角膜移植、晚期糖尿病患者的胰岛移植等开辟了新的路径, 同种异基因/同种异体器官移植 (Allogeneic / Allogenic organ transplant) 也得到广泛应用。随着器官移植的研究, 诸多棘手的问题也显现出来, 比如排斥反应 (Allograft rejection)^[1]。除了器官移植所需技术性要求, 诱导耐受和/或抑制免疫排斥成为临床器官移植亟待解决的研究重点。众所周知, 器官移植术后免疫反应主要分为移植物抗宿主反应 (Graft versus Host Reaction, GVHR) 和宿主抗移植物反应 (Host versus Graft Reaction, HVGR), 我们通常所指排斥反应主要指后者。

器官移植排斥反应依据移植物的来源及其遗传属性不同, 分为以下四类: ①自体移植, 指移植物来源于受者本身, 比如临床上烧伤病人的自体皮肤移植, 不会发生排斥反应; ②同系移植, 指遗传基因完全相同或相似的个体间的移植, 如单卵孪生的患者之间的肝、肾移植, 或近交系动物之间的移植, 理论而言, 一般也不发生排斥反应; ③同种异基因/同种异体移植, 指同种系, 但是遗传基因不同的个体之间的移植, 临床上较为常见, 多数亲属之间或者配型吻合患者之间移植多属此类型, 一般会发生急性或者慢性排斥反应; ④异种移植, 指不同种属个体之间的移植, 异种生物之间遗传背景和属性差异巨大, 比如临床上狒狒等灵长类动物器官移植入人体, 移植后多发生相当严重的超急性排斥反应。

根据不同的移植排斥反应免疫机制和反应快慢, 传统地将其分为超急性排斥反应 (Hyperacute Rejection, HAR)、急性排斥反应 (Acute Rejection)、延迟性排斥反应 (Delayed Rejection, DR) 亦称加速性排斥反应 (Accelerated Rejection) 和慢性排斥反应 (Chronic Rejection)。

1.1 超急性排斥反应 (HAR)

超急性排斥反应通常认为是由于受者体内存在针对供者特异性抗原的预存抗体或预存记忆性细胞。受者由于反复感染、妊娠、输血或曾接受过器官移植而

致敏，在移植物再灌注后数分钟或数小时内，预致敏记忆细胞或抗体迅速与移植物抗原特异和/或非特异反应、结合，激活补体介导的溶解反应，同时导致移植物的微血管系统广泛血栓形成，移植物功能迅速被破坏；ABO 血型不符的移植也属此类^[2]。往往在术中就可以看到，恢复血供后移植物由于发生淤血，颜色迅速转变为暗红色，体积膨胀，功能减弱。随后移植物血供减少，质地松软，实质是移植物缺血，同时移植物功能快速丧失。病理表现移植物间质出现逐渐加重的淋巴细胞和单核细胞浸润，最后使得移植物结构消失、坏死。超急性排斥反应一旦发生，难以及时应对、治疗，只能切除移植物，这也宣告移植的失败，但它可通过术前严格的 ABO 血型配合、组织相容性抗原试验（人类白细胞抗原 Human Leukocyte Antigen, HLA 配型，动物而言称为 MHC 分子），及淋巴细胞毒试验等而有效地预防^[3]。

1.2 延迟性排斥反应(DR)

延迟性排斥反应也称为加速性排斥反应，定义为第二次移植同一供者移植物出现的排斥反应加速现象；在异种移植，也多有发生此类反应。传统观点认为 DR 属 HAR，是一种急性体液免疫反应，但也有研究显示其病程、病理不同于 HAR，可单独列出研究。多在术后 2~5 日内发生，也可出现在术后 1 个月内。临床表现为移植器官功能迅速减退或丧失。病理表现为移植物小血管炎症和管壁的纤维素样坏死，实质为移植心脏的血管内血栓形成，大量巨噬细胞浸润及移植物坏死，但多无补体 C3 沉积^[4]。且不能完全被他克莫司（Tacrolimus, FK506）、抗胸腺细胞球蛋白(Anti-thymocyte globulin, ATG)、霉酚酸酯(Mycophenolate mofetil, MMF)及甲基强的松龙 (Methylprednisolone)所组成的四联免疫抑制方案逆转^[5]。

1.3 急性排斥反应

急性排斥反应是同种异基因移植排斥反应最为常见的类型，临床上多发生在移植术后 1 周-6 月之间。因此，急性排斥反应需与免疫抑制剂本身的毒副作用、原发性移植物功能不全等情况相鉴别^[6]。目前诊断急性排斥反应发生与否主要依靠移植物组织病理学检查。发生急性排斥反应时，病理表现为移植物内大量的 T 淋巴细胞浸润，早期主要是 CD4⁺T 细胞参与的细胞免疫和体液免疫，后期以

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”. Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库